J-TEC

取扱説明書

研究用試薬

メラノサイト含有ヒト 3 次元培養表皮モデル

LabCyte MELANO-MODEL

（ラボサイト メラノ･モデル）

MELANO-MODEL 24

MELANO-MODEL S

ご使用前に必ずお読みください

目次

Ⅰ. LabCyte MELANO-MODEL（ラボサイト メラノ・モデル）の特徴・・・・・・・・・・・・・3

Ⅱ. 梱包内容と各製品の名称・説明・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4

Ⅲ. 取り扱い・注意・・・5

Ⅳ. 使用方法

Ⅳ-1. メラニン形成試験・・7

Ⅳ-2. MTT アッセイ（生細胞数測定）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12

Ⅳ-3. メラニン量測定・・・16

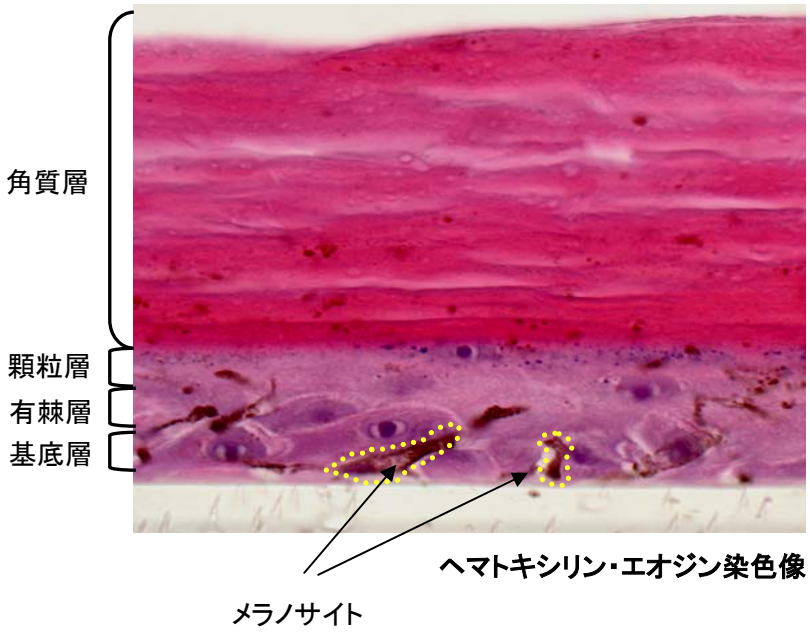
Ⅴ. ご注意・・19

このたびは「LabCyte　MELANO-MODEL　24（ラボサイト　メラノ･モデル　24）」または「LabCyte MELANO-MODEL S（ラボサイト　メラノ・モデル　S）」をお買い上げいただきましてありがとうございます。
ご使用前に本取扱説明書をお読みになり、美白研究など様々な皮膚研究にお役立てください。

Ⅰ．LabCyte MELANO-MODEL（ラボサイト メラノ・モデル）の特徴

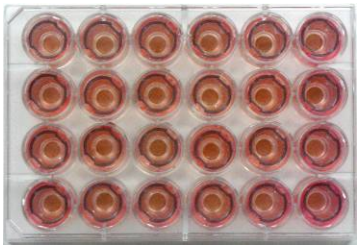
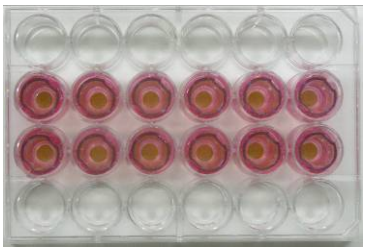
「LabCyte　MELANO-MODEL（ラボサイト　メラノ･モデル）」は、ヒト正常表皮細胞とヒト正常表皮メラノサイトを共培養し、重層化させたヒト 3 次元培養表皮モデルです。形態的にヒト皮膚に類似した構造をしており、基底層・有棘層・顆粒層・角質層を有します（表皮メラノサイトを含有している以外は、当社関連製品、LabCyte EPI-MODEL（ラボサイトエピ・モデル）と同じ構造です。
本製品は、メラノサイトの増殖やメラニン顆粒の形成を経時的に評価することによって美白効果試験、色素沈着試験などに利用できます。その他、様々な皮膚基礎医学研究に使用することも可能です。
また、本製品は、当社が開発している医療用培養表皮技術を応用した優れた技術により製造されています。このため、優れた品質安定性を有しており、再現性の高い評価試験結果が得られます。

LabCyte MELANO-MODEL



Ⅱ. 梱包内容と各製品の名称・説明

下記の製品が入っていますのでご確認ください。

製品名	MELANO-MODEL 24 メラノ・モデル　24	MELANO-MODEL S メラノ・モデル　S
メラノサイト含有ヒト 3 次元培養表皮モデル	メラノサイト含有ヒト 3 次元培養表皮モデルはアルミ包装されています。ヒト培養表皮は培養カップ上に入っており、培養カップは寒天培地中に固定されています。	
	24 ウェルプレートに **24 個入** 	24 ウェルプレートに **12 個入** 
12 ウェルアッセイプレート	寒天培地中に固定されたヒト培養表皮の入った培養カップを取り出し、この 12 ウェルアッセイプレートに移して使用します。	
	2 枚 	1 枚
改良メラニン産生促進培地	メラノサイト含有ヒト 3 次元培養表皮モデル専用培地 ＊ 2 週間培養可能な量です。培養期間を延長される方は改良メラニン産生促進培地（120mL)を別途お買い求めください。 培地は、冷蔵（2～8℃）で保存してください。使用期限はボトルのラベルに記載されています。	
	240mL	120mL

Ⅲ. 取り扱い・注意（製品の受け入れ）

① お受け取り後の確認

本製品をお受け取り後、直ちに開梱し、製品に破損や液漏れがないことを確認してください。万が一不良がございましたら、お手数をおかけいたしますが、下記までご連絡ください。

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング　営業部
TEL：0533-66-2129（直通）、FAX：0533-66-2018

② 保存と使用期限

メラノサイト含有ヒト 3 次元培養表皮モデルはアルミ包装状態のまま、室温（10～25℃）で保存してください。アルミ包装のラベルに記載された使用期限内にご使用ください。再現性を良くするために、試験をおこなうまでの保存期間を一定にすることをお勧めいたします。**開封後は、すべての培養カップを使い切ってください。**

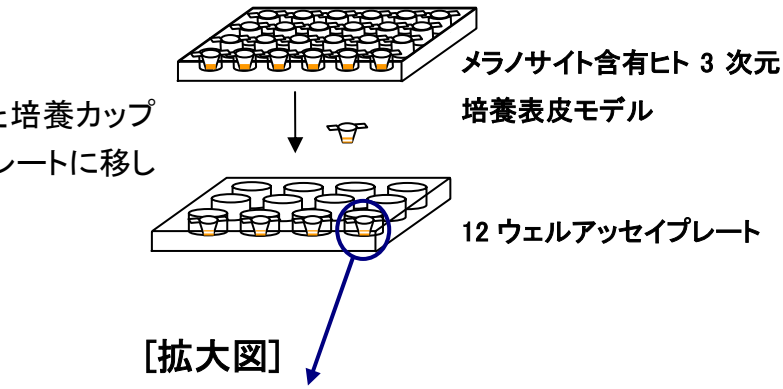
改良メラニン産生促進培地は、冷蔵（2～8℃）で保存してください。使用期限はボトルのラベルに記載されています。

Ⅳ. 使用方法

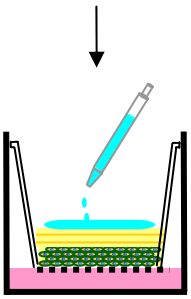
ここでは、本品を用いた試験・研究の一例をご説明いたします。お客様の目的に応じて、様々な試験・研究にご利用ください。

＜典型的な使用例＞

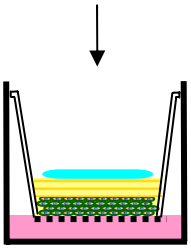
（1） ヒト培養表皮の入った培養カップを取り出しアッセイプレートに移します。



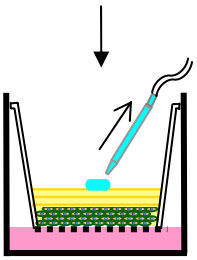
（2） 評価物質をヒト培養表皮表面に添加します。



（3） 培地交換を隔日で行いながら、2 週間培養します。



（4） 評価物質を取り除き、生細胞数やメラニン量を評価します。



Ⅳ-1. メラニン形成試験

＜試験の準備＞

① 機器

・クリーンベンチ（または安全キャビネット）
・ウォーターバス
・CO_2 インキュベーター（37℃、5～10%CO_2）

② 試薬・器具

・改良メラニン産生促進培地
・12 ウェルアッセイプレート【付属品・別売品】
・リン酸緩衝液（PBS）
・ピンセット（滅菌済み）
・ピペット類（滅菌済み）

＜試験方法＞

① 準備

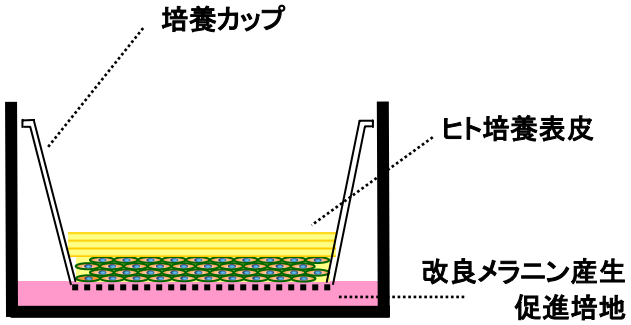
操作はクリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行ってください。

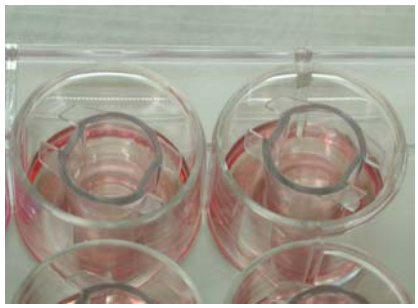
（1） 改良メラニン産生促進培地を 37℃のウォーターバスで温めます。
（2） 12 ウェルアッセイプレートの各ウェルに温めた改良メラニン産生促進培地を 1.5mL ずつ分注します。
（3） メラノサイト含有ヒト 3 次元培養表皮モデルをアルミ包装袋より取り出します。プレートのフタを開け、ヒト培養表皮が入った培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。

[Point] 培養カップ底面と寒天培地の間に空気を入れるようにすると容易に取り出すことができます。

〔CAUTION〕 培養カップ内のヒト培養表皮表面には触れないように注意してください。培養カップの外側に付着している寒天培地は、ピンセットなどで注意深く取り除いてください。

(4)　培養カップを改良メラニン産生促進培地の入った 12 ウェルアッセイプレートの各ウェルに移します。





培養カップはアッセイプレートのウェル内に静置してください

[CAUTION]
培養カップ表面に**気泡が入らないように**注意してください。気泡はピンセットで培養カップをゆすったりすると取り除くことができます。

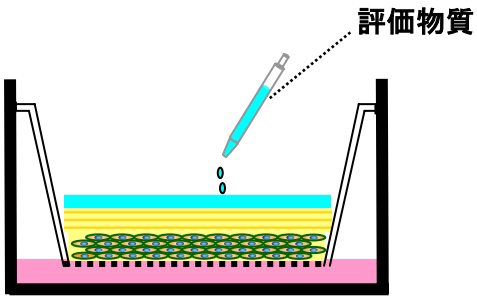
(5)　12 ウェルアッセイプレートにフタをして、CO_2 インキュベーターに入れます。
(6)　評価物質の暴露までに、最低 1 時間静置します。

② 評価物質の暴露

操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行ってください。

(1)　12 ウェルアッセイプレートを CO_2 インキュベーターから取り出します。

(2)　評価物質を培養カップのヒト培養表皮表面に必要量添加します（全面に均一にゆきわたらせてください）。陰性対照としては、評価物質の溶媒などを用いて、目的に応じて同様の操作をおこなってください。



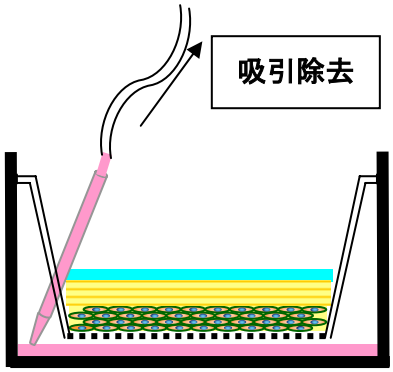
[Point]
評価物質の適用量は、液体の場合、通常 50μL です。最大 0.8mL まで適用することができます。粘性の高い物質や固形物質の場合は、天秤を用いて重量で適用してください。スパーテルなどを用いて、ヒト培養表皮表面を傷つけないように塗布してください。

(3)　12 ウェルアッセイプレートにフタをして、CO_2 インキュベーターに入れます。
暴露は目的の期間行ってください（必要に応じて評価物質の追加・交換なども行ってください）。

③ メラニン形成促進培養

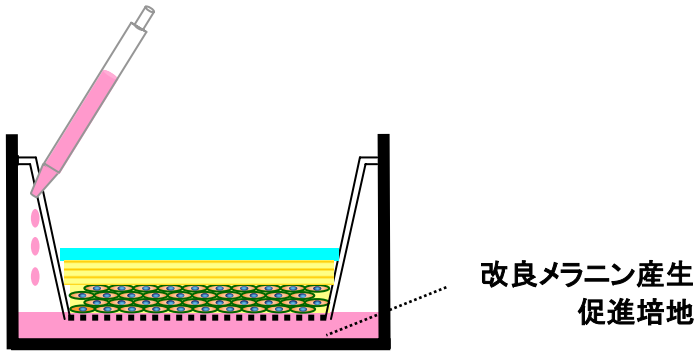
操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的に行ってください。

(1)　翌々日、12 ウェルアッセイプレートを CO_2 インキュベーターから取り出します。
(2)　各ウェルの培養カップ外側の培地を吸引除去してください。



[Point]
先端の細いパスツールピペット、またはアスピレーティングピペットを用いると容易に吸引することができます。

(3)　各ウェルの培養カップの外側に温めた改良メラニン産生促進培地を 1.5mL ずつ分注して培地交換をおこないます。



(4)　12 ウェルアッセイプレートにフタをして、CO_2 インキュベーターに入れます。

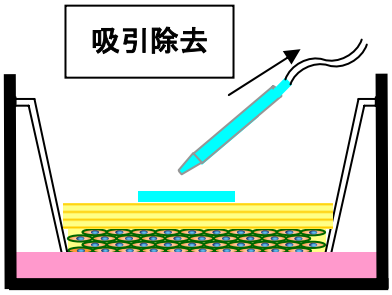
(5)　以後、同様の培地交換操作を目的の培養期間中は基本的に隔日でおこなってください。

[Point]
培地交換は 2 日に 1 回以上をお勧めします。ただし、週末は、土日を挟んで金、月曜日の培地交換も可能です。

培養期間は、通常 2 週間です。
陰性対照では、培養 1 週間目程度よりメラノ細胞の増殖が顕微鏡で観察され、培養 2 週間目には、肉眼でメラニン色素の増加が観察されます。

④ 評価前処理

(1) 培養カップ内の評価物質を吸引除去します。



〔CAUTION〕
ヒト培養表皮表面を傷つけないように注意しておこなってください。

(2) 残存している評価物質を取り除くため、リン酸緩衝液（PBS）で培養カップ内部を 3 回以上洗浄します。

〔CAUTION〕

リン酸緩衝液（PBS）をヒト培養表皮表面に強く吹き付けないでください。評価物質が残存する場合、キムワイプ・スパーテルなどを用いて、ヒト培養表皮表面を傷つけないように取り除き、再度洗浄を行ってください。万一、ヒト培養表皮が培養カップ底面から剥がれてしまった場合は、吸引しないように注意深く取り扱い、培養カップ底面に再度載せた状態で、次の処理を行ってください。

(3) 以後、組織固定を行っての組織標本の作製や、生細胞数やメラニン量などを評価できます。

Ⅳ-2. MTT アッセイ（生細胞数測定）

MTT アッセイ

細胞内に取り込まれた MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]が細胞内にあるミトコンドリアの脱水素酵素によって還元されて生じるフォルマザン色素を、有機溶媒により抽出して 570nm の吸光度を測定することで生細胞率を計測する方法です。

＜試験の準備＞

① 機器

・クリーンベンチ（または安全キャビネット）
・ウォーターバス
・CO_2 インキュベーター（37℃、5～10%CO_2）
・96 ウェルマルチプレートリーダー（540～590nm、650nm）

② 試薬・器具

・12 ウェルアッセイプレート【付属品・別売品】
・MTT 試薬【別売品】
・96 ウェル測定プレート【別売品】
・イソプロパノール
・リン酸緩衝液（PBS）
・ピンセット（滅菌済み）
・ピペット（滅菌済み）
・マイクロチューブ

＊ MTT 試薬、96 ウェル測定プレートは別売品としてご用意しております。
当社までお問い合わせください。

＜試験方法＞

① 準備

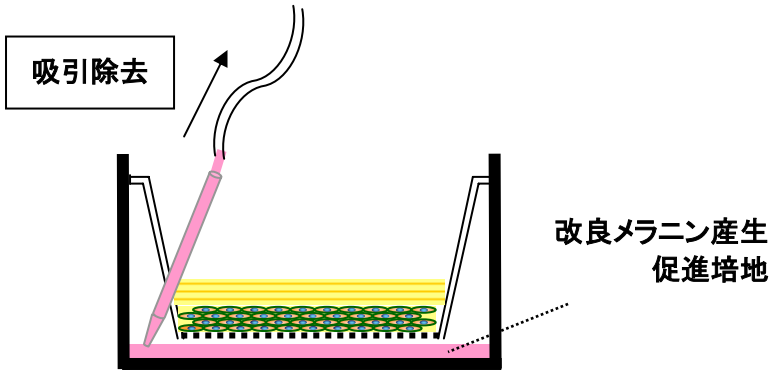
[Ⅳ-1. メラニン形成試験] に従い、生細胞数を測定するための評価物質を取り除いた表皮モデルを準備します。

② MTT 反応

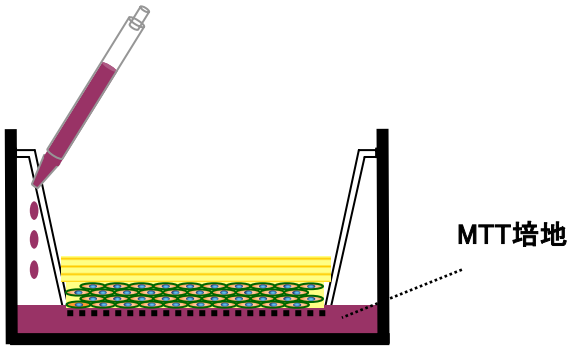
操作はすべて、クリーンベンチ（または安全キャビネット）内で無菌的におこなうことをお勧めいたします。

(1) MTT を培地（DMEM など）に溶解して、MTT 培地を調製します（終濃度：0.5mg/mL）。必要に応じて MTT 培地を、0.22μm、または 0.45μm フィルターでろ過滅菌します。MTT 培地は試験直前に用時調製します。溶解後は冷暗所で保存し、できるだけ早く使用してください（24 時間以内）。ご使用の 1 時間前には 37℃のウォーターバスで温めます。

(2) 各ウェルの培養カップの外側の改良メラニン産生促進培地を吸引除去します。



(3) 各ウェルの培養カップの外側に温めた MTT 培地を 1mL ずつ分注します。



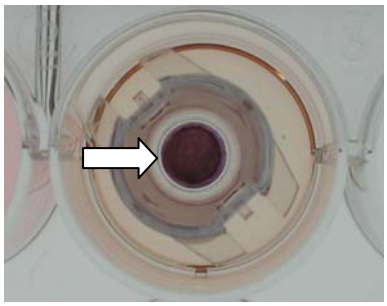
(4) 12 ウェルアッセイプレートにフタをして、CO_2 インキュベーターに入れます。

(5) **3 時間静置**します。

③ MTT 抽出・吸光度測定

操作はすべて、通常の実験室内でおこなうことができます（無菌操作の必要はありません）。

(1) MTT 反応終了後、24 ウェルアッセイプレートを CO_2 インキュベーターから取り出します。陰性対照のウェルが紫色に染まっていることを確認してください。

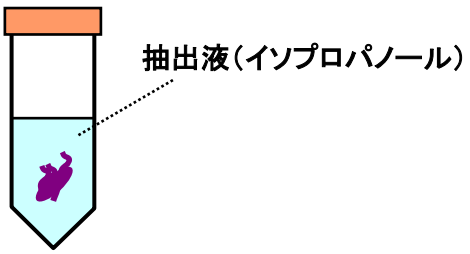


(2) 培養カップ底面のメンブランフィルターごとメスで切り取ってください。

(3) 各ヒト培養表皮片をマイクロチューブに入れます。

[Point] メンブランフィルターと組織を一緒にマイクロチューブに入れてください。
組織のみを剥がすと、メラニンの一部がフィルターに残る恐れがあります。

(4) マイクロチューブにイソプロパノールを入れ、ヒト培養表皮片を完全に浸漬します。



[Point] 抽出液量は、通常 200～300μL が適当です。

(5) 室温・暗所で 2 時間以上*静置して色素を抽出します。長時間抽出するときは、抽出液の蒸発を避けるため、チューブを完全に密栓してください。
*金曜日に抽出を開始して、月曜日に抽出液の回収をすることも可能です。

⚠ **[CAUTION]**

抽出の際にボルテックスミキサーの使用は避けてください。

組織がボロボロになると、洗浄の際に吸引してしまい、メラニン量が減少します。

組織からのフォルマザンの抽出は完全に行ってください。

抽出が不充分だと、組織に残ったフォルマザンがメラニン定量に影響します。

完全に抽出できるまで静置してください。

(6)　抽出終了後、マイクロチューブ内の抽出液をピペッティングにより良く混合して96 ウェルプレートの各ウェルに入れます。
ブランクには抽出液を用いてください。

[Point] 通常 1 ウェルあたり 150-250μL で測定します。

(7)　96 ウェルマルチプレートリーダーを用いて、540～590nm（通常 570nm）の吸光度を測定します。650nm の吸光度を差し引くことにより、より正確なデータを得ることができます。

(8)　陰性対照の吸光度からブランクの吸光度を引いた値を 100%として、評価物質の生細胞率を算出します。

$$\text{生細胞率}(\%) = \frac{\text{評価物質の吸光度—ブランクの吸光度}}{\text{陰性対照の吸光度—ブランクの吸光度}} \times 100$$

Ⅳ-3. メラニン量測定

＜試験の準備＞

① 機器

・ウォーターバス（45℃、80℃）
・CO_2 インキュベーター（37℃、5～10%CO_2）
・96 ウェルマルチプレートリーダー（405nm、570nm）

② 試薬・器具

・96 ウェル測定プレート【別売品】
・メラニン（検量線作成用）
・ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）
・エチレンジアミン四酢酸（EDTA）
・Tris-HCl（pH6.8）
・Proteinase K
・炭酸ナトリウム
・過酸化水素水
・クロロホルム
・メタノール
・ピンセット（滅菌済み）
・ピペット（滅菌済み）
・マイクロチューブ

＜試験方法＞

操作はすべて、通常の実験室内でおこなうことができます（無菌操作の必要はありません）。

① 準備

メラニン測定用のヒト培養表皮は以下のいずれかの方法により準備してください。

（1） [Ⅳ-2. MTT アッセイ]でイソプロパノールによりフォルマザンを抽出し終わったヒト培養表皮を繰り返しイソプロパノールにより洗浄し、フォルマザンを完全に除去したものを用意します。イソプロパノールの混入をなくすため、、メラニン定量前に PBS で1，2度洗浄してください。

（2） MTT アッセイ用のヒト培養表皮とは別に、[Ⅳ-1. メラニン形成試験]―②評価物質の暴露、③メラニン形成促進培養の操作を行ったものを用意します。

② 試薬の調製

下記の試薬を調製してください。

- 溶液 A（1% SDS、0.05 mM EDTA、10 mM Tris-HCl）
- 5 mg/mL Proteinase K 溶液
- 500 mM 炭酸ナトリウム溶液
- 30% 過酸化水素水
- クロロホルム：メタノール（2：1）溶液

③ メラニン量定量

(1) 1 ウェル分のヒト培養表皮をフィルターごとメスなどで切り取り、マイクロチューブに入れます。

(2) マイクロチューブに溶液 A を 150 μL 入れ、ヒト培養表皮片を完全に浸漬します。

[Point]

200 μg/mL のメラニン溶液を、溶液Aを溶媒として調製してください。メラニンは容易に溶解できませんが、超音波洗浄機などを用いる、あるいは凍結・融解を数回繰り返すなどを行い十分に溶解してください。検量線を作成するために必要です。

SDS が泡立ちやすいため、まず溶液 A から SDS を除いたものに溶解した後、SDS を加えると良いでしょう。

＜検量線作成用メラニン溶液＞

200 μg/mL の溶液を 100, 50, 25, 12.5 μg/mL に希釈して、200, 100, 50, 25, 12.5 μg/mL の溶液を作製します。マイクロチューブに各濃度の溶液を 150 μL ずつ分注し、以下の処理を同様におこなってください。

(3) さらに 5 mg/mL Proteinase K 溶液を 3 μL 加え、よく混合します。

(4) 45℃のウォーターバスで一晩温めます。

(5) よく攪拌し（ボルテックスミキサーなどを使用すると効果的です）、ヒト培養表皮片を完全に破砕します。

[Point]

一晩処理後、ヒト培養表皮片はほとんど溶解した状態になっています。ボルテックスミキサーなどでよく攪拌してもヒト培養表皮片の形が残っている場合は、反応が不十分ですので、さらに 5 mg/mL Proteinase K 溶液を 3 μL 加え、45℃で 4 時間温めてください。

(6)　500 mM 炭酸ナトリウム溶液を 25 μL、30%　過酸化水素水 5 μL を加え、よく混合します。

(7)　80℃のウォーターバスで 30 分温めます。

(8)　室温でしばらく放置して、冷やします。

フタを空ける前に十分に冷却してください。

チューブ内で蒸発している水分を遠心などで回収することで、誤差をふさげます。

[Point]

この段階でメンブランフィルターを取り除くと、後の操作が容易になります。

(9)　クロロホルム：メタノール（2：1）溶液を 20 μL 加え、よく混合します。

(10)　15,000rpm・10 分間遠心します。

(11)　遠心終了後、マイクロチューブ内の上清（140−180　μL）を注意深く 96 ウェルプレートの各ウェルに入れます。

[Point]

溶液が泡立っているため、サンプルのなかで上清のボリュームが最も少ないものに合わせて分取すると良いでしょう。

[CAUTION]

下層が一部でも混入すると大きな誤差となりますので、下層を絶対に混入させないように注意してください。

また、ウェルに上清を入れた際に泡が入ると測定値に影響がでます。

(12)　96　ウェルマルチプレートリーダーを用いて、405nm　の吸光度を測定します。570nm　の吸光度を差し引くことにより、より正確なデータを得ることができます。

(13)　同時に処理した各濃度のメラニン溶液の吸光度より検量線を作成し、ヒト培養表皮のメラニン量を算出します。

Ⅴ. ご注意

- 本製品は研究用以外の目的で使用しないでください。
- いかなる場合においても、ヒト・動物への適用や in vitro 診断に用いることは認められていません。
- ウィルス（HIV, HBV, HCV, HPV）感染に関する検査は実施しておりますが、ご使用に際しては十分にご注意ください。
- ご使用に際しては、目的の評価物質での予備試験をおこなうことをお勧めいたします。
- 本製品の本来の使い方以外で生じたいかなる事故や損害についても、当社は一切の責任を負いかねますので、ご了承ください。
- 本製品のご入荷後において、以下のような場合には、本製品の返品・交換はいたしかねますので、ご了承ください。
  (1) 不当な取り扱いによる損傷
  (2) 落下等の不注意による損傷
  (3) 火災、地震、水害、落雷、その他の天変地変等の不可抗力による損傷
- 本製品をご使用後は、適切な処理を行なった上で廃棄してください。

J-TEC

【製造・販売元】
株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
〒443-0022　愛知県蒲郡市三谷北通 6-209-1
TEL：0533-66-2020（代表）　FAX：0533-66-2018
E-Mail：jtec-info@jpte.co.jp　　URL：http://www.jpte.co.jp

2011.10 改訂
（111021）